



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ARMANDO RODRIGUES LOPES PEREIRA NETO

**LACTAMAS E NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO
POTENCIAIS AGENTES ANTIBIOFILME E
ANTIMICROBIANOS: ESTUDO *IN VITRO***

**FLORIANÓPOLIS
2013**

ARMANDO RODRIGUES LOPES PEREIRA NETO

**LACTAMAS E NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO
POTENCIAIS AGENTES ANTIBIOFILME E
ANTIMICROBIANOS: ESTUDO *IN VITRO***

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de DOUTOR em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

**Florianópolis
2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto

Lactamas e Nanopartículas de Prata como Potenciais Agentes
Antibiofilme e Antimicrobianos: Estudo In Vitro / Armando Rodrigues
Lopes Pereira Neto ; orientador, Ricardo de Souza Magini - Florianópolis,
SC, 2013.

77 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Inibidores de biofilme. 3. lactamas, nanopartículas de
prata. 4. PLGA-HA. 5. funcionalização de biomateriais. I. , Ricardo de Souza
Magini. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia. III. Título.

ARMANDO RODRIGUES LOPES PEREIRA NETO

**Lactamas e Nanopartículas de Prata Como Potenciais Agentes
Antibiofilme e Antimicrobianos: estudo *in vitro***

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de “Doutor em Odontologia”, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 16 de Agosto de 2013.

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Andréa de Lima Pimenta
Membro

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti
Membro

Prof. Dr. Daniel Romeu Benchimol de Resende
Membro

Prof. Dr. Max Pinto da Costa da Rocha
Membro

“Um pouco de ciência nos afasta de
Deus. Muito, nos aproxima.”

Luis Pasteur

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Célio e Célia**, jamais conseguirei expressar o quanto eu sou grato por todo o apoio e confiança depositados em mim, sempre. Vocês são, juntos, os meus maiores exemplos de caráter, integridade e generosidade. Espero que, um dia, eu possa ser para os meus filhos, pelo menos metade do que vocês foram e são pra mim. Amo vocês.*

*À **Gabriela**, as turbulências da vida são facilmente vencidas quando não estamos sozinhos. Juntos temos conseguido transpor várias adversidades e construir momentos de felicidade plena. Obrigado por me compreender, consolar e mostrar que tudo que passamos tem um motivo de ser.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pai, porque tudo, absolutamente tudo que conquistei durante a minha vida foi porque Ele permitiu. Continue sempre ao meu lado, meu Senhor.

Ao **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, meu orientador e amigo, por todo conhecimento a mim transmitido durante o doutorado, pelas oportunidades, pela paciência durante todos os dias do nosso convívio e pelas orientações completamente indispensáveis para a conclusão do doutorado, que contribuíram para minha formação na Implantodontia e Periodontia e fizeram com que definitivamente me apaixonasse pela carreira acadêmica.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Cardoso**, pela sabedoria repassada e por ter aberto minha cabeça para a constante busca de conhecimento dentro da Implantodontia, por me ensinar a confiar em mim e por mostrar que apenas com muito trabalho e dedicação chegarei em algum lugar.

Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini**, pela atenção e confiança e por estar disponível para qualquer tipo de questionamento sempre que necessário, se tornando indispensável para a conclusão desta etapa de minha vida.

Ao amigo e **Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti**, por sempre estar disponível quando precisei e pelos conselhos e dar a maioria das oportunidades profissionais que me ajudaram a concluir esse curso de pós-graduação. Nossa amizade é verdadeira e ainda perdurará por anos.

A amiga e **Profa. Dra. Andréa de Lima Pimenta**, porque sem você este trabalho não teria acontecido. Obrigado por todo o conhecimento passado a mim, pelo voto de confiança depositado. Tenha certeza que serei grato pelo resto de minha vida pela ajuda.

A **Prof. Dr. Luismar Marques Porto**, pela oportunidade de adquirir conhecimento dentro da cultura celular animal e, principalmente, por ter possibilitado que uma parte desta pesquisa se realizasse dentro do Intelab. Espero que este seja apenas o primeiro de muitos trabalhos que realizaremos juntos. O meu muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. Águedo Aragones**, por ter cedido os polímeros para essa e outras pesquisas, sempre muito atencioso e com gana científica invejável.

Aos amigos **Ernesto, Gustavo, João e Guenther** passamos de colegas de pós-graduação à grandes parceiros. Mais importante que a conclusão desse Doutorado, é a amizade que construímos. Um agradecimento também as suas respectivas esposas, **Samantha, Larissa, Renata e a Dani**.

Ao amigo e irmão **José**, sempre estiveste do meu lado, em bons e maus momentos, me acolheste na tua casa e com isso criei a minha família de Florianópolis, tendo como pais o **Seu Moisés e a Dona Sueli**, onde passei diversos dias dos pais e das mães, além de almoços de domingo. O meu muito obrigado! E não podia deixar também de agradecer a **Bibi**, que fez o papel da minhas primas, aqui em Florianópolis, a quem considero também uma irmã.

Ao amigo e irmão **Marcos (Kiko)**, a caminhada não foi fácil aqui Floripa, mas foi possível porque nós unimos nossa forças. Eu o considero parte da minha família e nossa amizade é pra vida toda. Um agradecimento, também para **Lilian**, que muito participou dessa jornada a seu lado.

As amigas do Intelab **Camila Quinetti, Camila e, em especial, a Lya**, somente graças a ajuda de vocês consegui desenvolver grande parte desse trabalho e considero que nos tornamos além de colegas, bons amigos.

Aos professores e amigos **Gláucia, Ariadne, Zendron e Arnop** por todos os ensinamentos transmitidos e pelos momentos de descontração que fizeram com que me sentisse em casa dentro da UFSC.

Aos amigos da Unique **Mario, Cristiane, Cristina, Camila, Sol e Sarah**, pelas dicas e experiências transmitidas que me fizeram crescer dentro da nossa profissão.

As funcionárias **Mirian, Gisella, Silvane e Nilcéia**, vocês representam muito bem o nosso ambiente de trabalho e são diretamente responsáveis por este ser tão prazeroso.

Aos amigos de fora da UFSC *Duda, Greise, Nelsinho, Bahia, Marina, André, Mari, Amanda, Willian, Nina e Fabinho,*

Aos colegas do curso de Doutorado, *Newton e Pamela,* pela convivência desde o mestrado, sempre em busca de um crescimento acadêmico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Composição química da lactmas sintéticas.....	48
Figura 2 A-F	Imagens obtidas no MEV. <i>A</i> – apresenta a estrutura do disco de PLGA-HA; <i>B</i> – imagem do grupo controle, mostra a formação de biofilme de cepas de <i>E. faecalis</i> ; <i>C, D, E, F</i> – imagens dos grupos testados com os compostos U 21-1, U 21-2, U 27-2 e NpAg, respectivamente onde podem ser observadas microcolônias bacterianas, comprovando a eficácia desses compostos na inibição de biofilme.....	54
Figura 3 A-F	Células semeadas sobre discos de PLGA-HA analisadas pelo ensaio live/dead para os tempos experimentais 24, 48 e 72 h. <i>A-C</i> – imagens live/dead de queratinócitos HaCaT; <i>D-F</i> – imagens live/dead de fibroblastos HDFa. Células vivas coradas em verde, enquanto células mortas foram coradas de vermelho. Alta concentração de células viáveis em todos os tempos experimentais mostrando a compatibilidade do polímero.....	59
Figura 4 A-F	Células semeadas sobre discos de PLGA-HA analisadas por meio do microscópio confocal para os tempos experimentais 24, 48 e 72 h. <i>A-C</i> – imagens de queratinócitos HaCaT; <i>D-F</i> – imagens de fibroblastos HDFa. Nota-se o espalhamento celular sobre o PLGA-HA com penetração para o interior do polímero 72 h após a semeadura (Fig. C e F).....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos 1-4 -	Valores expressos em porcentagem \pm desvio padrão para viabilidade de queratinócitos HaCaT para os compostos tratados. * indica significância estatística quando comparado como controle ($p < 0,05$). ANOVA e Teste de Múltipla Comparação de Bonferroni.....	56
Gráficos 5-8 -	Valores expressos em porcentagem \pm desvio padrão para viabilidade de fibroblastos HDFa para os compostos tratados. * indica significância estatística quando comparado como controle ($p < 0,05$). ANOVA e Teste de Múltipla Comparação de Bonferroni.....	57
Gráficos 9-10 -	Valores expresso em porcentagem \pm desvio padrão. 9 - viabilidade de queratinócitos HaCaT semeados sobre o polímero PLGA-HA; 10 - viabilidade de fibroblastos HDFa semeados sobre o polímero PLGA-HA. Resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados como controle ($p > 0,05$). ANOVA e Teste t de Student.....	58

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Valores para inibição de aderência e adesão de biofilme de <i>E. faecalis</i> expressos em porcentagens \pm desvio padrão, dos compostos testados na CIM.....	53
-------------------	---	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	23
Resumo.....	25
Abstrat.....	27
 CAPÍTULO II	 29
Introdução.....	31
Objetivos.....	37
 CAPÍTULO III	 39
1 – Artigo.....	41
 CAPÍTULO IV	 67
1 – Bibliografia Consultada.....	69

CAPÍTULO I

PEREIRA-NETO, Armando Rodrigues Lopes. **Lactamas e Nanopartículas de prata como potenciais agentes antibiofilme e antimicrobianos: estudo *in vitro***. 2013. 75f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração Implantodontia) – Curso de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

As doenças periodontal e peri-implantar são processos infecciosos, dependente da patogenicidade dos microrganismos responsáveis. A utilização de antibióticos tem sido frequente, associada terapias convencionais, para o combate dessas infecções, contudo seu uso indiscriminado tem gerado o aparecimento de resistência bacteriana. Como alternativa, compostos que inibem mecanismos regulatórios das bactérias vêm sendo testados, tendo como alvo a inibição da virulência sem interferir com a viabilidade bacteriana. Dentro desta nova classe de antimicrobianos não convencionais destacam-se os compostos que atuam na inibição do biofilme bacteriano. Assim, o objetivo deste estudo é analisar a capacidade antibiofilme de três lactamas, derivadas de furanonas cuja a atividade contra o biofilme bacteriano é reconhecida, e de nanopartículas de prata, utilizadas em concentrações subinibitórias, na formação de biofilmes de *Enterococcus faecalis* sobre um material polimérico implantável. A atividade de três lactamas sintéticas, U 21-1, U 21-2 e U 27-2, foi avaliada sobre discos de PLGA-HA, e comparadas com as de concentrações subinibitórias de nanopartículas de prata (NpAg). Ensaios de inibição de aderência e formação de biofilme e observação ao MEV foram escolhidos para quantificar e qualificar a formação de biofilme de *E. faecalis*. A viabilidade de células cultivadas sobre o polímero foi acessada através de ensaios colorimétricos e confirmada pelo ensaio Live/Dead e a adesão das células foi caracterizada por microscopia confocal. Todos os compostos apresentaram taxas de redução de biofilme superiores à 99%, o que foi comprovado com as imagens obtidas pelo MEV. Nas CIM, os índices de viabilidade celular de todos os compostos foi superior ao preconizado para aprovação para uso clínico, tendo as lactamas apresentado resultados superiores aos das NpAg. Os resultados aqui apresentados indicam que lactamas e nanopartículas de prata apresentam excelente potencial para utilização no tratamento da doença periodontal e se associados ao PLGA-HA podem ser utilizadas na prevenção de peri-implantites.

Palavras-chave: Inibidores de biofilme, lactamas, nanopartículas de prata, PLGA-HA, funcionalização de biomateriais.

PEREIRA-NETO, Armando Rodrigues Lopes. **Lactams and Silver Nanoparticles as a Potential Antibiofilm and Antimicrobial Agents: an *in vitro* study.** 2013. 75f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração Implantodontia) – Curso de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

Periodontal and peri-implant diseases are infection pathologies related to the pathogenicity of the microorganisms involved. The use of antibiotics has been frequently associated with conventional therapies for the combat these infections, however the widespread use of these antimicrobial compounds has led to the emergence of bacterial resistance. Alternatively, compounds that inhibit bacterial regulatory mechanisms controlling virulence, have been tested in the view of developing a new generation of antimicrobial drug targeting inhibition of virulence without interfering with bacterial viability. Within this new class of antimicrobials some of the most promising are those interfering with bacterial biofilms. Here we analysed the effects of three novel synthetic lactams, derived from furanones whose antibiofilm activities are recognized, and of subinibitory concentrations of silver nanoparticles (AgNPs), on biofilms of *Enterococcus faecalis* formed over an Implantable polymeric material. The behavior of human cells cultured over this biomaterial in the presence of those compounds was also accessed, in view of developing functionalized implantable devices. Inhibition assays of adhesion and biofilm formation and SEM observation were used to quantify and qualify the biofilm formation of *E. faecalis*. Viability of cells cultured on the surface of this polymer was accessed via colorimetric assays and cell adhesion was characterized by confocal microscopy. All compounds showed biofilm inhibition rates higher than 99%, as accessed by CFU counts and in agreement with images obtained by SEM. At the CIM, human cells viability indexes of all compounds were higher than those recommended for approval in clinical use, with lactams showing better results than AgNPs. Results presented here indicate that lactams and silver nanoparticles have excellent potential for use in the treatment of periodontal disease and in association with PLGA-HA can be used in the prevention of peri-implantitis.

Key words: Biofilm inhibitors, lactams, silver nanoparticles, biomaterial, PLGA-HA.

CAPÍTULO II

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Doença periodontal e peri-implantar

As doenças periodontais são classificadas em duas formas: gengivite e periodontite. O termo gengivite refere-se a uma inflamação gengival, sem sinais de perda dos tecidos de suporte, enquanto a periodontite, além da inflamação gengival, é caracterizada pela perda óssea. Esse processo é bactério-dependente e a severidade é regulada pela presença de fatores de risco, como o fumo, estresse e alterações sistêmicas, e da resposta do hospedeiro. Estudos epidemiológicos apontam que cerca de 80% da população apresenta perdas de inserção da ordem de 5 mm ou mais (SUSIN et al., 2004; SUSIN et al., 2005).

Da mesma forma que nos tecidos periodontais, o desequilíbrio da interação entre bactéria e hospedeiro provoca injúrias aos tecidos que circundam os implantes osseointegráveis. Tais alterações, quando se limitam aos tecidos moles, são denominadas mucosites, caracterizadas por uma reação inflamatória reversível nos tecidos moles circundantes ao implante em função; contudo, se houver progressão para os tecidos duros, com aparecimento de perdas ósseas, passam a ser classificadas com peri-implantites e, usualmente, possuem caráter irreversível (ABREU et al. 2007; HEITZ-MAYFIELD et al., 2008; ZITZMANN et al., 2008).

A análise de material orgânico coletado do sulco gengival e do sulco clínico peri-implantar revelou similaridade entre a microbiota responsável pela destruição dos tecidos que circundam implantes e dentes. Esse grupo bacteriano é composto por microrganismos gram-negativos e gram-positivos, aeróbios e anaeróbios. Dentre essas bactérias responsáveis pela doença periodontal, pode-se citar a *Tannerella forsythia*, *Tannerella denticola*, *Porfiromona gingivalis* e *Enterococcus faecalis* (SOCRANSKY et al., 1992; RAMS et al., 1992).

E. faecalis, bactéria isolada de bolsas periodontais ainda na década de 90 (RAMS et al., 1992), é Gram-positiva facultativa e considerada um patógeno oportunista em vários tipos de infecções hospitalares de pacientes imunocomprometidos (HANCOCK et al., 2006). Esses microrganismos normalmente habitam o trato gastrointestinal dos seres humanos, animais campestres, cães, gatos, patos e muitos tipos de insetos (HANCOCK et al., 2006). O alarmante surgimento, na América do Norte, durante os últimos 20 anos

de cepas de *E. faecalis* resistentes à a diversos antibióticos disponíveis no mercado, incentivou um aumento no número de estudos voltados a descobrir a melhor forma de tratar e prevenir infecções por *Enterococos* (AAS et al., 2005; ARIAS et al., 2008). *E. faecalis* orais se agrupam à outros tipos bacterianos de maneira a formar a placa dental, o biofilme oral, e desse modo atuam na progressão da doença periodontal (COLOMBO et al., 1998). *E. faecalis* tem sido associada com agravamento da destruição periodontal em bolsas infectadas (BALAEI-GAJAN et al., 2010) e também em lesões gengivais necrosantes, em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (GONÇALVES et al., 2009; RAMOS et al., 2012).

1.2 – Biofilme, o “Quorum Sensing” e alternativas para o controle bacteriano

O biofilme bacteriano é conceituado como uma população bacteriana vivendo em uma estrutura organizada, complexa e dinâmica, associada à uma superfície. Essa população bacteriana é encapsulada em uma matriz de substâncias exopoliméricas extracelulares, produzidas e secretadas pelas próprias bactérias e constituída de exopolissacarídeos, proteínas e em alguns casos DNA, que confere estabilidade, permite a estruturação e protege as células bacterianas (DAVIES, 2003).

A organização de um biofilme ocorre de maneira semelhante independentemente da linhagem bacteriana existente. Esta formação pode ser dividida em cinco estágios:

a) Inicialmente ocorre fixação reversível de bactérias planctônicas à uma superfície (RICHARDS & MELANDER, 2009);

b) Em seguida, esta fixação torna-se irreversível; neste momento, inicia-se uma etapa de secreção da matriz extracelular, a qual irá estruturar o biofilme. Essa matriz é em parte responsável por tornar as bactérias resistentes aos antimicrobianos e por conferir proteção contra a desidratação e radiação UV (RICHARDS & MELANDER, 2009);

c) Num terceiro momento, ocorre a maturação da comunidade microbiológica, por meio do recrutamento de outras bactérias planctônicas, do crescimento das micro colônias iniciais e eventualmente do recrutamento de outros microrganismos (MUSK & HERGENROTHER, 2006).

d) Em seguida, o biofilme passa a apresentar uma conformação tridimensional. Esse tipo de organização confere grande heterogeneidade estrutural, com a presença de diferentes microambientes que diferem entre si quanto à disponibilidade de O₂ e

nutrientes. Esta diversidade estrutural induz à diferenciação metabólica das bactérias no interior do biofilme (DAVIES, 2003).

e) Após a maturação do biofilme, algumas bactérias da periferia passam de um estado sésil a um estado flagelar móvel, em resposta à sinais vindos da própria comunidade bacteriana. Este fenômeno acarretaseu desligamento da matriz do biofilme, possibilitando dispersão do mesmo e posterior colonização de um novo ambiente.

Em biofilmes orais, o processo inicial de aderência bacteriana ocorre de forma organizada. Minutos após a higiene oral, forma-se a chamada película adquirida na superfície dental e de implantes osseointegrados. Esta película apresenta estrutura glicoproteica, composta por componentes da saliva e do fluido gengival, bem como de bactérias e produtos celulares do hospedeiro (LISTGARTEN, 1972; LISTGARTEN, MAYO, TREMBLAY, 1975; LISTGARTEN, 1976).

Um primeiro grupo de bactérias colonizadoras adere-se a receptores presentes na película. Estes colonizadores primários são predominantemente gram-positivos (FACHON-KALWEIT, ELDER, FIVES-TAYLOR, 1985; FIVES-TAYLOR & THOMPSON, 1985). Esta estrutura, denominada placa bacteriana, sofre um processo de maturação a partir da colonização das bactérias já aderidas, além da aderência e crescimento de outras espécies. Esse processo torna o perfil microbiota predominantemente gram-negativo anaeróbico.

Em um biofilme, as bactérias podem atuar como um entidade multicelular quando um determinado nível populacional é atingido. A percepção dessa densidade populacional pelas bactérias é resultado de uma comunicação intercelular, mediada pela produção de sinais moleculares sintetizados pelas células individualmente, chamados de autoindutores (AIs), (DAVIES, 2003; HALL-STOODLEY et al., 2004) e detectados por receptores específicos. Esta comunicação permite às células bacterianas regular a expressão de conjuntos de genes especializados em resposta à densidade celular. Quando o nível crítico populacional é atingido, caracterizando um “quorum”, as bactérias passam a agir em grupo como um único organismo multicelular (DAVIES, 2003). Este mecanismo ficou conhecido como “Quorum Sensing” (CHA et al., 1998).

O comportamento coletivo pode trazer vantagens, como por exemplo, a possibilidade de migração para ambientes com melhor oferta de nutrientes e a adoção de novos modelos de crescimento, tais como esporulação ou formação de biofilmes, o que propicia proteção contra os efeitos deletérios do ambiente (RICHARDS & MELANDER, 2009).

Bactérias organizadas em biofilmes passam a se beneficiar do mecanismo de percepção da densidade populacional (quórum), já que agindo de forma comunitária tornam-se capazes de resistir à agentes convencionais de biocontrole que visam inibir a proliferação de microrganismos patogênicos que induzem, por consequência, o aparecimento de formas de resistência do patógeno (CHA et al., 1998).

Uma vez que a maioria das bactérias patogênicas existe na forma de comunidades de biofilmes, o que reduz a eficácia dos antibióticos e facilita a evolução de espécies resistentes (CARNIOL & GILMORE, 2004; GIRINDHARA UPADHYAYA, UMAPATHY, RAVIKUMAR, 2010), a descoberta de compostos capazes de inibir a formação de biofilme atuando no mecanismo de QS favorece o combate às infecções microbianas, inclusive às doenças periodontal e peri-implantar.

A interrupção do QS pelos inibidores ocorre por meio da repressão da geração do sinal, do bloqueio dos receptores de sinais ou da degradação destes sinais (HENTZER & GIVSKOV, 2003). Diferentemente dos antibióticos, os inibidores de QS não matam os patógenos diretamente, apenas atuam na repressão, bloqueio e/ou degradação dos sinais moduladores, interferindo consequentemente na virulência dessas bactérias. Isto implica em uma redução da pressão de seleção e em menor possibilidade de desenvolvimento de resistência por parte das bactérias (REN et al., 2001).

Apesar dessas vantagens, as informações sobre o mecanismo de QS são limitadas e a utilização dos inibidores do QS ainda está em estágio pré-clínico (HENTZER & GIVSKOV, 2003). Uma classe de compostos que desempenha este papel é o grupo das furanonas halogenadas naturais. Estes compostos foram inicialmente isolados da alga vermelha *Delisea pulchra* e apresentaram atividade inibitória contra a formação de biofilme em *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (REN et al., 2001; REN et al., 2002). Seu mecanismo de atuação no QS, contudo, não está claramente definido. Alguns estudos relataram que sua atuação ocasiona mudanças conformacionais por meio de degradação proteolítica. (MOHAMED & HUANG, 2007). Outros autores acreditam que as furanonas atuam em mais de uma via do QS (REN et al., 2001; HENTZER et al., 2002). Todavia, diversos trabalhos corroboram com o fato de as furanonas apresentarem grande potencial de combate a comunidades bacterianas. (HENTZER et al., 2002).

A dificuldade na obtenção de furanonas naturais estimulou o desenvolvimento de compostos semelhantes, de origem sintética, com resultados promissores (HE et al., 2012). Dentre esses compostos e com composição química semelhante a furanonas sintéticas, estão as

lactamas. A composição química desses compostos difere pelo fato de as lactamas apresentarem um átomo de oxigênio próximo à carbonila, enquanto que as furanonas, o átomo próximo ao anel central é de nitrogênio (MANEFIELD et al 2002; HENTZER et al., 2003). Graças à essa similaridade estrutural, acredita-se que as lactamas possam apresentar potencial para a inibição de biofilme semelhante ao de algumas furanonas naturais e sintéticas,, e por este motivo esta família de compostos foi escolhida para a realização do trabalho ora descrito

Também como alternativa a antibióticos, nanopartículas de prata (NpAg) tem sido usada em diversos campos da medicina (CHOPRA, 2007). Um exemplo, é aplicação em curativos para infecções do tecido ósseo, possibilitando a redução do período de administração concomitante de antibióticos sistêmicos (SHAHVERDI et al., 2007). Isto porque atua de maneira local no combate a infecções já que apresentam grande solubilidade, reatividade química.

O mecanismo de ação ainda não é completamente entendido (LUBICK, 2008). Todavia, é sabido que as nanopartículas de prata atuam em um amplo espectro bacteriano, incluindo gram-positivas e gram-negativas, por meio da competição com moléculas ligantes de proteínas estruturais e funcionais desses grupos bacterianos e apresentaram-se efetivas no combate à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* e *Streptococcus species* (STEVENSON et al., 2009)

Contudo, vale ressaltar que a utilização clínica desses compostos impõe, como no caso de qualquer outro produto, que os mesmos não agredam as células humanas. Para testar esta biocompatibilidade, as técnicas que envolvem cultura celular são indispensáveis. Este tipo de estudo tem como principal vantagem a facilidade de padronização da amostra, pois o pH, a temperatura, a tensão de CO₂ e de O₂ e a pressão de CO₂ podem ser controlados facilmente. Além disso, o modelo de estudo de cultura de células possibilita a obtenção de culturas idênticas e tem baixo custo quando comparado a estudos *in vivo* (FRESHNEY, 1990).

1.3 Polímeros biodegradáveis e suas aplicações

Os copolímeros Poli (DL-láctido-co-glicólido) (PLGA) são biomateriais também muito utilizados na biomedicina, revestindo tubos, cateteres urinários, fios de sutura, fixações ósseas (MA, 2004; PARK et al., 2005).

No entanto, tais dispositivos geralmente causam infecções bacterianas, o que limita suas aplicações clínicas (Sun, RANGANATHAN, FENG, 2008). Além disso, por não apresentar bioatividade, eles não se ligam ao tecido ósseo nem promovem qualquer mecanismo de formação de *novo osso* sobre a sua superfície após a implantação (WANG et al., 2004).

Entretanto, o revestimento dos polímeros com hidroxiapatita por meio do processo biomimético confere aos implantes bioatividade com o tecido ósseo, deficiente em cálcio (OHURA, NAKAMURA, YAMAMURO, 1991; DAROUICHE, 1999). Na última década, a indústria e a comunidade acadêmica despertaram interesse em nanocompósitos, que são obtidos por dispersão de nanopartículas inorgânicas em matrizes poliméricas. Isto porque a presença de nanopartículas melhora as propriedades mecânicas do material, como resistência ao calor, permeabilidade a gases e biodegradabilidade dos polímeros (NEO, KOTANI, NAKAMURA, 1992; BOCKSTALLER, MICKIEWICZ, THOMAS 2005).

Polímeros com nanopartículas de metal incorporadas são interessantes por suas propriedades ópticas, elétricas, catalíticas e biomédicas (TJONG, 2006). Nanocompósitos biodegradáveis à base de nanopartículas metálicas como ouro, titânio e prata, são aplicados como sensores ou transdutores no diagnóstico e tratamento de doenças (ALOISI et al., 2006; ALOISI et al., 2010).

Recentemente, foi demonstrado que a incorporação de nanopartículas de prata (NpAg) ao PLGA reduziu fortemente o crescimento bacteriano. Em baixas concentrações (30 a 700 ppm), estas nanopartículas são capazes de induzir mudanças morfológicas na superfície do polímero e afetar a molhabilidade e rugosidade do mesmo (LATTERINI et al., 2007), influenciando no processo de adesão bacteriana (LEE, NAGAHATA, HORIUCHI, 2006) e prevenindo a formação de biofilme.

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral:

Avaliar o potencial de utilização de lactamas e NPsAgs enquanto inibidores da formação de biofilmes sobre materiais poliméricos visando a funcionalização de dispositivos implantáveis.

2.2 – Objetivos Específicos:

a) Analisar a capacidade de inibição da formação e adesão de biofilmes bacterianos das lactamas U21-1, U21-2, U27-2, e das NpAg; sobre polímeros de PLGA-HA.

b) Analisar a citotoxicidade e a biocompatibilidade de tais compostos e do polímero PLGA-HA frente à células humanas;

CAPÍTULO III

ARTIGO**LACTAMAS E NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO
POTENCIAIS AGENTES ANTIBIOFILME E
ANTIMICROBIANOS: ESTUDO *IN VITRO***

Este artigo está formatado sob as normas da revista Journal of Periodontology.

Nanopartículas de Prata e Lactamas como potenciais agentes antimicrobianos e antibiofilme: estudo *in vitro*

Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto^a

Lya Piaia^b

Camila Quinetti Paes^b

Águedo Aragone^a

Luismar Marques Porto^d

Ricardo de Souza Magini^a

Andréa de Lima Pimenta^{a,b,*}

^aCentro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários - CEPID, Departamento de Odontologia, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

^bLaboratório de Tecnologias Intergadas - Intelab, Departamento de Engenharia Química, CTC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Endereço para Correspondência:

Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto

Rodovia Amaro Antonio Vieira 2463, apto 405C

88034-101 – Itacorubi, Florianópolis – SC - Brasil

Tel: (48) 3209-9172 – (48) 9944-9909

e-mail: armandopn@gmail.com

* Permanent address: Cergy-Pontoise University, Department of Biology

RESUMO

Introdução: Doenças que acometem os tecidos periodontais e peri-implantares possuem etiologia bacteriana. Terapias mecânicas de combate as infecções são comumente associadas a antibióticos sistêmicos ou locais, o que pode gerar resistência bacteriana. O objetivo deste estudo é testar nanopartículas de prata e lactamas, como potenciais agentes para o controle de biofilme

Material e Métodos: Foram utilizados nanopartículas de prata e três tipos de lactamas sintéticas. A capacidade de influenciar no controle do biofilme sobre discos de PLGA-HA foi testada pelo ensaio de quantificação de adesão bacteriana e formação do biofilme, e confirmado por análises de MEV. A biocompatibilidade em células humanas foi avaliada para linhagens de queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (HDFa). Testes de viabilidade celular (MTT e MTS), ensaio Live/Dead, a microscopia confocal foram elencados para testar a compatibilidade das nanopartículas de prata (NpAg), das lactmas e do polímero PLGA-HA.

Resultados: A viabilidade celular do polímero foi confirmada pelo ensaio Live/Dead e a adesão das células caracterizada por microscópio confocal. Todos os compostos reduziram o biofilme em mais de 99% o que foi comprovado com as imagens obtidas pelo MEV. As lactamas testadas apresentaram índices de viabilidade celular superiores às NpAg ($p \geq 0,05$), e nas CIM todos os compostos apresentaram porcentagens de sobrevivência celular que aprovam sua utilização.

Conclusão: Lactamas e nanopartículas de prata apresentam potencial para utilização no tratamento da doença periodontal e se associados ao PLGA-HA podem atuar no tratamento de peri-implantites e como barreira físicas para processos regenerativos.

1 - INTRODUÇÃO

As doenças periodontais (DP) são processos infecciosos, bactério-dependente e a severidade é regulada pela presença de fatores de risco, da resposta do hospedeiro. A prevalência aponta para de 80% da população como portadora dessa patologia (SUSIN et al., 2004; SUSIN et al., 2005). Da mesma forma que nos tecidos periodontais, o desequilíbrio da interação entre bactéria e hospedeiro provoca injúrias aos tecidos que circundam os implantes osseointegráveis (DPi). Estas são classificadas como mucosites quando limita-se a mucosa peri-implantar e peri-implantite quando provoca reabsorções ósseas (BERGLUNDH et al. 1992; ERICSSON et al. 1992; ABREU et al. 2007; HEITZMAYFIELD et al. 2008; ZITZMANN et al. 2008).

Um vasta microbiota é responsável por essas destruições teciduais. Dentre as bactérias responsáveis pelas DP e DPi, pode-se citar a *Tannerella forsythia*, *Tannerella denticola*, *Porfiromona gingivalis*, *Enterococcus faecalis* (Socransky et al. 1992; Rams et al. 1992). *E. faecalis* é uma bactéria gram-positiva e considerada um patógeno oportunista de diversas infecções humanas, incluindo as DP e DPi (RAMS et al. 1992; YOUNG et al. 2001; SOUTO et al. 2006; SOUTO & COLOMBO, 2008). O aparecimento de várias cepas de *E. faecalis* resistentes à diversos antibióticos disponíveis no mercado levou ao aumento no número de estudos voltados a descobrir a melhor forma de tratar e prevenir infecções por *Enterococos* (SUNG & SONG, 2011).

Dentre as alternativas desenvolvidas à antibioticoterapia convencional, tem ganhado destaque os inibidores de “Quorum sensing” (QS) (CHA et al., 1998). Este é um mecanismo regulatório responsável pelo controle de genes ligados à virulência bacteriana, que são ativados ou desativados em toda a população bacteriana quando o nível crítico populacional é atingido, caracterizando um “quorum”. Desta forma o QS orchestra comportamentos cooperativos, fazendo com que bactérias passem a agir em grupo como um único organismo multicelular (DAVIES, 2003).

Dentre as substâncias que atuam no QS, a família das lactonas tem apresentado resultados importantes no controle do biofilme. Estes compostos foram isolados da alga vermelha *Delisea pulchra* e apresentaram atividade inibitória contra a formação de biofilme em *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (REN et al., 2001; REN et al., 2002). Seu mecanismo de ação ainda não é completamente entendido, porém alguns estudos indicam que sua possam atuar induzindo mudanças

conformacionais por meio de degradação proteolítica. (MOHAMED& HUANG, 2007). Outros autores acreditam que as furanonas atuam em mais de uma via do QS (REN et al., 2001; HENTZER et al., 2002). Contudo é um consenso que, de alguma forma estes compostos atuam em alguma etapa específica do QS (HENTZER et al., 2002).

As Nanopartículas de Prata (NpAg) têm também desempenhado funções de combate a infecções com sucesso (CHOPRA, 2007). Foi relatado que sua aplicação em curativos para infecções do tecido ósseo diminui o período de administração de antibióticos sistêmicos (SHAHVERDI et al., 2007). Isto porque atuam de maneira local no combate a infecções já que apresentam grande solubilidade, reatividade química. O mecanismo de ação ainda não é completamente compreendido (LUBICK, 2008). Apesar da controvérsia a respeito de seu potencial citotóxico e aos mecanismos de ação, devido ao seu amplo espectro, as NpAgs continuam sendo alvo de pesquisas visando viabilizar sua utilização na área da saúde (STEVENS et al., 2009).

Toda utilização de compostos antimicrobianos em medicina e odontologia, se é dependente da utilização de um carreador ou suporte. Os copolímeros Poli (DL-láctido-co-glicólido) (PLGA) são biomateriais que podem desempenhar esse papel, devido sua biocompatibilidade, capacidade de molhabilidade e resitência o que é potencializado pela hidroxiapatita (HA) e seu efeito tampão (MA, 2004; PARK et al., 2005; Sun, RANGANATHAN, FENG, 2008).

O presente estudo visa avaliar um trio de lactamas sintéticas, estruturalmente semelhantes às furanonas, e NpAg no controle de biofilme de uma cepa de *E. faecalis*, bem como determinar a citotoxicidade e a biocompatibilidade de tais compostos e do polímero de PLGA-HA frente à linhagens celulares humanas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material biológico e condições de cultura

A linhagem bacteriana utilizada no estudo foi *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). Cepas foram mantidas em TSB (Tryptic Soy Broth) suplementado com glicerol (v/v) 20% à temperatura de -20 °C, e rotineiramente cultivados em TSB. As condições para a produção do biofilme para esta cepa foram previamente otimizadas (dados não apresentados) e serão mencionadas quando necessário.

As linhagens de células humanas utilizadas no estudo foram de fibroblastos humanos dérmicos (HDFa) e queratinócitos humanos da derme (HaCaT) (Sigma-Aldrich, St. Luis, EUA), os quais foram adquiridos pelo Laboratório de Tecnologias Integradas - Intelab, da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2 - Preparo dos discos de PLGA + HA

Os arcabouços foram obtidos pela técnica de evaporação de solvente. O copolímero de poli (ácido lático-co-glicólico) – PLGA (Boehringer Ingelheim), na proporção 82:18 (m:m), foi dissolvido em clorofórmio (Merck) (10% m/v) em temperatura ambiente. Após a dissolução completa do polímero, partículas de sacarose (Synth) (30% m/v) com tamanho inferior a 1.000 μm e de hidroxiapatita (20% m/v) (Genius, Baumer, Mogi Mirim, Brasil) foram adicionadas. A solução foi vertida em moldes de 6 cm^2 . Após a evaporação do solvente à temperatura ambiente, a sacarose foi removida com a utilização de álcool poli-vinílico (PVA) e os discos foram recortados de acordo com as dimensões das placas de culturas (5 e 10 mm de diâmetro). Em seguida foram embaladas em sterile bag e esterilizadas em radiação gama com carga de 20 kGy.

2.3 – Antibiofilmes testados

As lactamas utilizadas nesse estudo foram sintetizadas pelo grupo de Prof. Luiz Cláudio A. Barbosa, do Departamento de Agroquímica, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (Fig. 1) e utilizadas na concentração inibitória mínima (CIM) proposta por Pimenta et al (2003).

As NpAg utilizadas nesse estudo foram fornecidas pela TNS (Florianópolis, Brasil) e apresentam-se como uma dispersão coloidal de prata metálica em meio aquoso, com pH de aproximadamente 4,0, estabilizadas com moléculas orgânicas e apresentando um tamanho médio de partículas de 10nm, variando de 5 à 20 nm.

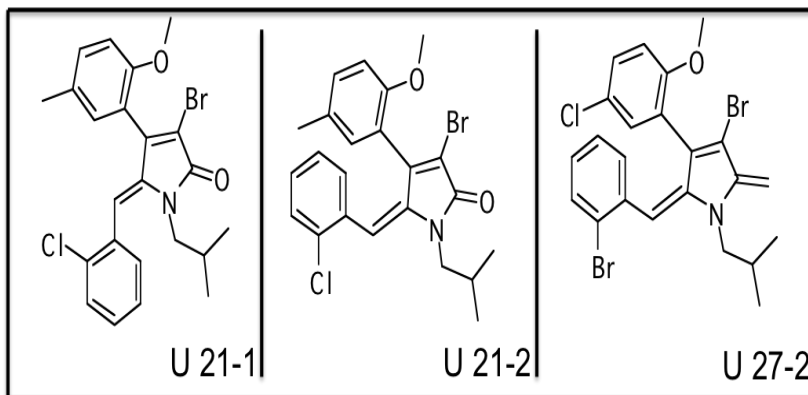


Fig. 1 – Estrutura química da lactmas sintéticas utilizadas neste estudo.

2.4 – Ensaios de inibição de aderência e formação de biofilme

As cepas-teste foram cultivadas em meio TSB, à 37°C sem agitação, até atingirem a fase exponencial tardia (~24h). Uma diluição de 10^3 deste pré-inóculo foi utilizada para semear o meio de cultura no qual foram mergulhados os discos de polímeros a serem testados com ou sem presença ou ausência das substâncias inibidoras de biofilme. Após uma incubação de 24h em câmara úmida à 37°C, os polímeros foram transferidos para eppendorfs contendo 1 ml de solução salina 0,9% estéril e vortexados durante 5min. A suspensão bacteriana assim obtida foi em seguida diluída sucessivamente também em solução salina.

Alíquotas de 100 µl das diluições apropriadas foram plaqueadas em meio Miller-Hinton e as placas incubadas à 37°C por 24h. Após este período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para a quantificação do número de bactérias aderidas aos discos de polímero e o número de UFCs/ml calculado de acordo com as diluições. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Foram considerados positivos para inibição de biofilme os compostos que apresentaram pouca ou nenhuma interferência no crescimento bacteriano, tendo sido capazes de reduzir a aderência e formação de biofilme das linhagem-teste em no mínimo 50%.

2.5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise por meio de MEV, as amostras foram lavadas com PBS e fixadas em glutaraldeído 4% em PBS por 30min. Em seguida, foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (30, 50, 60, 70, 80, 90% GL e álcool absoluto) por 15min cada. A secagem em ponto crítico foi feita em um aparelho Bal-Tec CPD030 (Bal-Tec, Lienchteinstein). As amostras foram recobertas com uma camada de Ouro-Palladium e levadas para análise em MEV (Zeis DSM 940A Carls Zeis, Alemanha), com o intuito de verificar a organização do biofilme sobre o polímero, na presença ou não de inibidores.

2.6 – Cultura de fibroblastos e queratinócitos

Foram realizadas culturas dos fibroblastos HDFa e queratinócitos HaCaT. Em seguida, inibidores de biofilme foram aplicados a fim de se verificar sua biocompatibilidade com estas células e seu comportamento espacial na presença dos mesmos e do polímero de PLGA-HA.

Antes do processo de descongelamento, o meio de cultura foi aquecido em banho-maria para atingir uma temperatura próxima aos 37°C e evitar um choque térmico possivelmente danoso às estruturas celulares. Após, 5 ml de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium, Gibco) foram adicionados às garrafas de cultura. Então, o criotubo contendo as células eternizadas foi descongelado em temperatura ambiente. Após o completo descongelamento, o criotubo foi centrifugado em uma velocidade de 1000 rpm durante 2min e o sobrenadante foi desprezado.

As células foram ressuspensas em meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 1% de solução antibiótica e antifúngica (PSA). Este conteúdo foi despejado em uma garrafa de cultura de 25cm³. Novamente, foi adicionado o meio de cultura específico acrescido de 10% de SFB e 1% de PSA. A garrafa foi levada à incubadora à 37°C e 5% de CO₂ durante 1 h. Após esse período, um tapete de células foi visualizado no fundo da garrafa. O sobrenadante foi desprezado e 5 ml de meio de cultura foram adicionados. A garrafa foi levada novamente à incubadora e após 24 h de descongelamento, o meio de cultura foi trocado. A partir daí, a troca do meio foi realizada a cada 48 h. O processo foi repetido para ambos os tipos celulares (HDFa e HaCaT).

2.7 – Viabilidade celular

Com o intuito de analisar a viabilidade celular, utilizou-se o teste colorimétrico MTT para os compostos e o MTS para o polímero com ambas as células. Para tal, as células foram semeadas no dia 0 em uma placa de cultura na proporção de 1×10^5 células por poço. Cada lactama foi diluída em meio de cultura celular DMEM em 4 diferentes concentrações: 43,75; 87,5; 131,25 e 175 $\mu\text{g/ml}$.

Após 24 h da semeadura, o meio foi trocado e foi adicionado o meio de cultura celular completo contendo os compostos diluídos e as placas incubadas por 24 h. Foram realizados controles-positivo (células e meio), controles-negativo (meio) e um controle de DMSO. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Foi realizado o ensaio colorimétrico MTT [3 - (4,5-dimethylthiazolyl-2) -2,5-difenil tetrazolium bromide] (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) com pequenas modificações para os compostos (Mosmann, 1983; Sieuwerts et al., 1990). Para tanto, o meio foi removido e 50 μl de solução de MTT (1 mg/ml) foram adicionados. As placas foram reincubadas por 4 h. Depois disso, a solução de MTT foi removida e 100 μl de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazana. As placas foram gentilmente agitadas, para dissolução completa dos cristais. As medidas de absorbância foram realizadas por meio do espectrofotômetro (Infinite M200, TECAN, Áustria GmbH, Grödig, Áustria), a 540 nm, e as percentagens de células viáveis foram calculadas em relação ao controle positivo, não tratadas.

Com o intuito de avaliar a proliferação desses tipos celulares (HDFa e HaCaT) em contato com o polímero, foi realizado o ensaio MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Células na densidade de 1×10^5 foram semeadas sobre discos de PLGA-HA, em triplicata, e incubadas por 24 h. Em seguida, o meio foi gentilmente removido e as células foram lavadas com PBS duas vezes. Após, 300 μl de meio acrescidos de 60 μl de solução de MTS foram dispensados sobre os discos e incubados em estufa à 37°C e 5% de CO_2 . Após 1 h foi realizada a leitura da absorbância por meio de um leitor de ELISA, no comprimento de onda de 490 nm.

2.8 - Teste de viabilidade Live/Dead para o polímero PLGA-HA

A viabilidade celular foi avaliada por meio do teste Live/Dead, o qual utiliza dois compostos fluorescentes (acetometoxi-calceína e iodeto de propídio) para marcar células vivas e mortas, respectivamente.

Ao entrar nas células vivas, a acetometoxi-calceína é clivada por esterases celulares e libera calceína (excitação/emissão 495/515 nm), a qual fluoresce na cor verde e fica retida no interior da célula. O iodeto de propídio penetra apenas em células mortas; ele intercala-se ao DNA das mesmas e assume fluorescência vermelha (excitação/emissão 495/635 nm).

Assim, 5×10^5 células foram semeadas sobre um disco de PLGA-HA em placas de 24 poços, diluídas em 500 μ l de meio de cultura completo e incubadas por 24 e 48 h em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Após cada período, 2 ml de PBS estéril foram colocados em um tubo falcon de 15 ml, e então foram adicionados 4 μ l da solução A e 1 μ l da solução B e misture a solução final, que continha aproximadamente 2 μ M calcein AM e 4 μ M EthD-III. Esta solução de trabalho foi adicionada diretamente às células. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com PBS. Então, foram adicionados 500 μ l de solução e 50 μ l de solução de trabalho do Kit. As células, então, foram incubadas em estufa por 45min e analisadas no microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japão).

2.9 - Teste de adesão celular

Células na densidade de 5×10^5 foram semeadas sobre discos de PLGA-HA em placas de 24 poços, diluídas em 500 μ l de meio de cultura completo e incubadas por 24, 48 e 72 h em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Após os períodos experimentais, o meio foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com PBS pré-aquecido (pH 7,4). Em seguida foram fixadas em formaldeído 3,7% diluído em PBS por 10min à temperatura ambiente e depois lavadas novamente com PBS 2 vezes. Os polímeros foram colocados no poço de outra placa e cobertos com uma solução de 0,1% Triton-X-100 diluído em PBS reagindo durante 5min.

Foram utilizados os corantes Faloídina para citoesqueleto e Dapi para o núcleo celular. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e adicionadas a uma solução com 500 μ l de PBS+Albumina e 12 μ l da solução metanólica de faloídina por 20min em temperatura ambiente, protegida de luz. Para a marcação do núcleo celular, as amostras foram

lavadas com PBS 3 vezes e incubadas com 1 μ L de solução de DAPI, acrescidas de 999 μ L PBS por 30 segundos. Em seguida, foram lavadas com solução de PBS-Tween 20 (400 μ L de PBS e 200 μ L de Tween 20) por 5min. Essa lavagem foi repetida 3 vezes e por fim foi realizada uma lavagem final com PBS.

2.10 - Análise estatística

Para cada micro placa a leitura foi convertida em porcentagens, com os valores controle considerados como 100%. Resultados para as concentrações dos tipos de furanonas e das NPAg foram tratados da mesma maneira para a análise estatística. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão(DP) e analisados por meio de ANOVA juntamente com o Teste de Múltipla Comparação de Bonferroni para testes com compostos e suas diferentes concentrações e ANOVA juntamente com o Teste t de Student, para os testes com o polímero PLGA-HA. Os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$.

3 - RESULTADOS

3.1 – Ensaios de inibição de aderência e de formação de biofilme

Os resultados da análise quantitativa de inibição de aderência, feita por contagem do número de UFCs/ml após descolamento de biofilme formado em presença e ausência dos inibidores foram expressos em porcentagem (\pm desvio padrão) na Tabela 1. Todos os compostos apresentaram notável redução da presença de bactérias em biofilme. Os compostos da classe das lactamas apresentaram valores de inibição de $99,57\% \pm 5,83$, $99,77\% \pm 3,53$ e $99,86\% \pm 9,54$ para, U 21-2, U 27-2 e U 21-1 respectivamente. Os resultados das NPAg pouco diferiram dos compostos sintéticos, o metal apresentou inibição de $99,91\% \pm 1,23$.

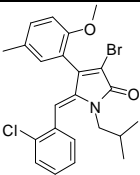
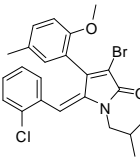
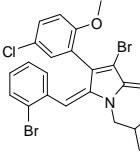
Composto	Composição Química	Concentração	% Inibição de Biofilme (DP)
U 21-1		87,50 µg/ml	99,86 (± 9,54)
U 21-2		87,50 µg/ml	99,57 (± 5,83)
U 27-2		87,50 µg/ml	99,77 (± 3,53)
NPAg	--	5 ppm	99,91 (± 1,23)

Tabela 1 – Valores para inibição de aderência e adesão de biofilme de *E. faecalis* expressos em porcentagens \pm desvio padrão, dos compostos testados na CIM.

A morfologia superficial do polímero foi observada em imagens obtidas pelo MEV e apresentou-se similar em todos os grupos (Fig. 2), o que mostra que as amostras de polímeros são homogêneas e que, portanto, não há interferência da superfície na aderência bacteriana. Através destas imagens, foi possível observar a formação de um biofilme organizado nas amostras do grupo-controle e significativa redução no número de bactérias nas amostras dos grupos expostos aos agentes anti-biofilme e nos grupo das NpAgs, o que confirma os resultados obtidos com os testes de inibição de aderência.

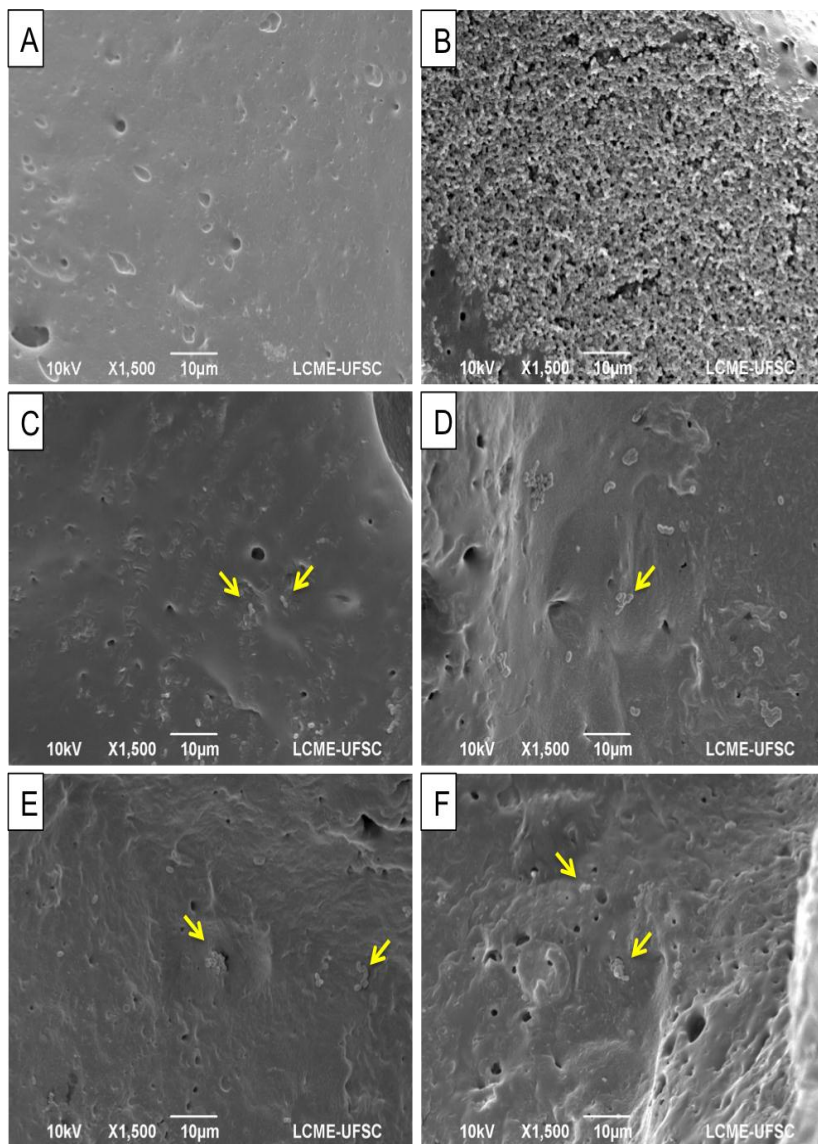


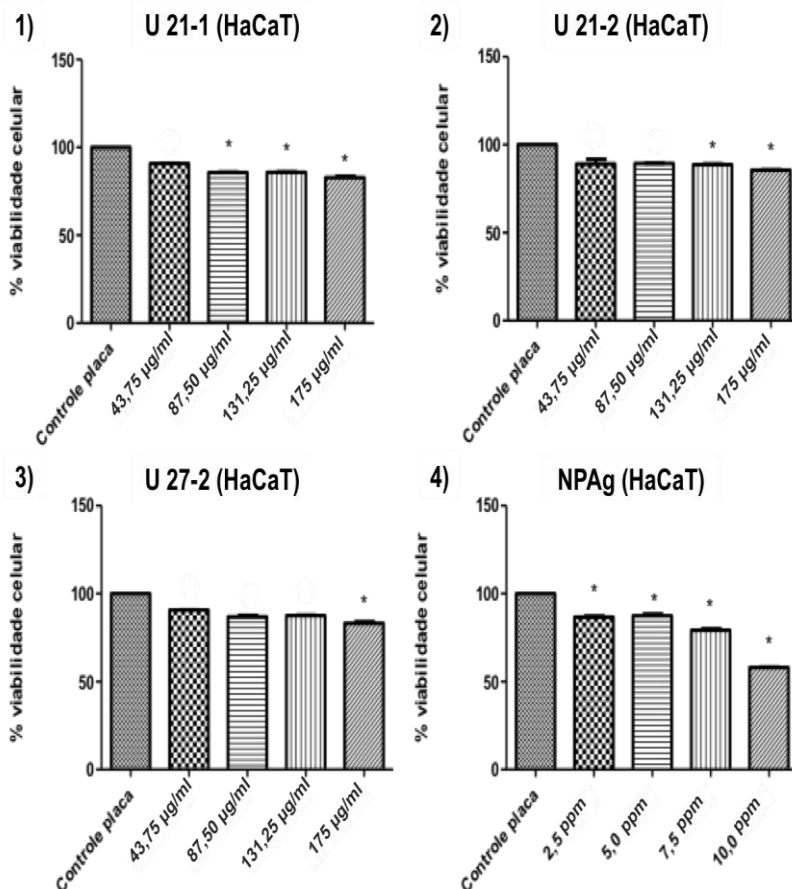
Fig. 2 A-F –Imagens obtidas no MEV. A – apresenta a estrutura do disco de PLGA-HA; B – imagem do grupo controle, mostra a formação de biofilme de cepas de *E. faecalis* em ausência de inibidores; C, D, E, F – imagens dos grupos testados com os compostos U 21-1, U 21-2, U 27-2 e NpAg, respectivamente onde pode ser observados diminutas micro colônias bacterianas, comprovando a eficácia desses compostos na inibição de biofilme.

3.2 – Testes de viabilidade celular

A viabilidade celular dos compostos foi acessada por meio do teste colorimétrico MTT. As células HaCaT em contato com o composto U 21-1 nas concentrações de 43,75; 87,5; 131,25 e 175 $\mu\text{g/ml}$ apresentaram porcentagens de viabilidade celular de $91,35\% \pm 0,15$, $86,21\% \pm 0,54$, $86,21 \pm 0,64$ e $83,24\% \pm 1,56$ respectivamente (Gráfico 1). Com exceção dos resultados obtidos com a concentração de 43,75 $\mu\text{g/ml}$, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo experimental e o controle, indicando toxicidade celular, apesar da alta taxa de células viáveis presentes.

O composto U 21-2 revelou-se tóxico às HaCaT ($p < 0,05$) nas concentrações de 131,25 e 175 $\mu\text{g/ml}$ (taxa de viabilidade celular de $89,18\% \pm 0,9$ e $86,10\% \pm 0,35$ respectivamente). Já o composto U 27-2 apresentou altas taxas de viabilidade celular em todas as concentrações, com diferença estatisticamente significativa apenas na concentração de 175 $\mu\text{g/ml}$ ($83,51\% \pm 1,73$) (Gráficos 1-3).

Ainda com relação às HaCaT, o grupo das NpAg apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação de todas as concentrações com o grupo-controle (taxas de viabilidade celular de $87,02\% \pm 1,25$, $87,83\% \pm 2,12$, $79,72\% \pm 1,75$ e $58,37\% \pm 0,8$ para as concentrações de 2,5, 5, 7,5 e 10 ppm, respectivamente), indicando que este composto apresenta toxicidade aos queratinócitos em todas as concentrações testadas (Gráfico 4).

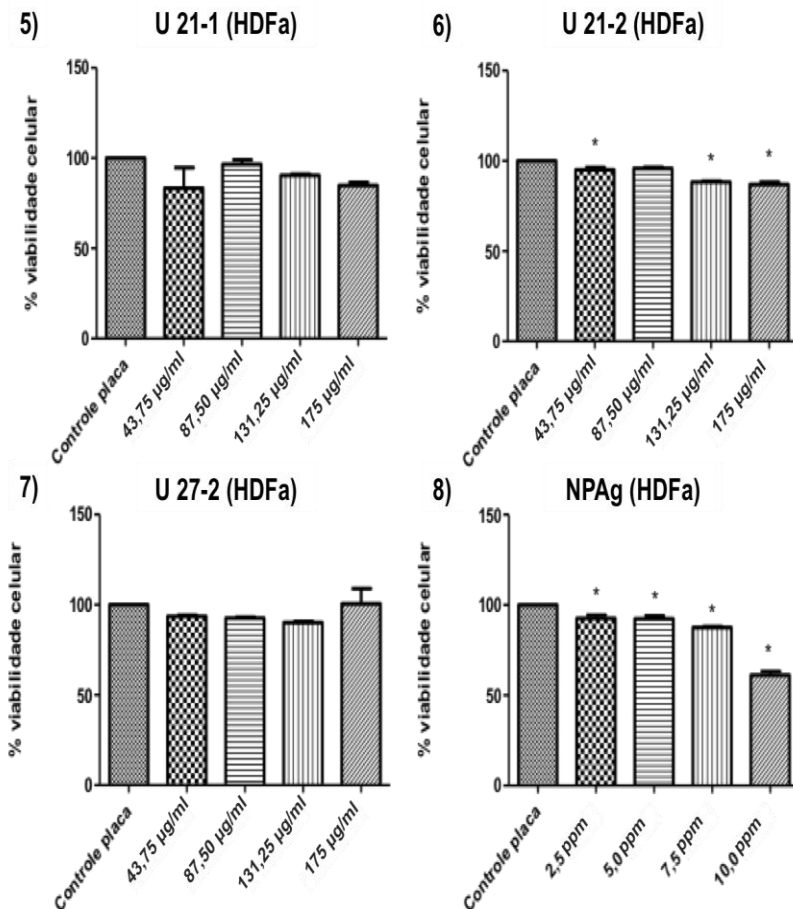


Gráficos 1-4 – Valores expresso em porcentagem \pm desvio padrão para viabilidade de queratinócitos HaCaT para os compostos tratados. * indica significância estatística quando comparado como controle ($p < 0,05$). ANOVA e Teste de Múltipla Comparação de Bonfferoni.

Com relação à viabilidade celular dos fibroblastos (HDFa), após seu contato com o composto U 21-1, diferenças estatisticamente significantes foram observadas somente quando usada a concentração de 10 mg/ml, na qual as células apresentaram taxas de viabilidade celular de $86,50\% \pm 3,47$ (Gráfico 5). O composto U 21-2, contraditoriamente, apresentou boa viabilidade celular apenas na concentração de 5 mg/ml ($p < 0,05$), valores expressos no gráfico 6. Já a lactama U 27-2 apresentou

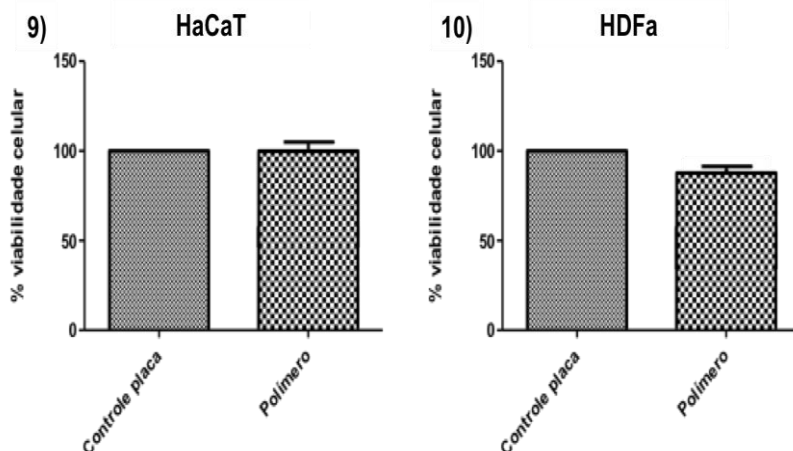
altas taxas de viabilidade celular, sem diferenças estatisticamente significativas com relação ao grupo-controle para nenhuma das concentrações (Gráfico 7). Esse dados mostram que os compostos não apresentaram toxicidade à esse tipo celular.

As NPAg apresentaram, com os fibroblastos, resultados semelhantes aos obtidos com a linhagem HaCaT, revelando-se tóxicas em todas as concentrações (Gráfico 8).



Gráficos 5-8 – Valores expressos para porcentagem \pm desvio padrão para viabilidade de fibroblastos HDFa para os compostos tratados. * indica significância estatística quando comparado como controle ($p < 0,05$). ANOVA e Teste de Múltipla Comparação de Bonferroni.

Os resultados do teste com MTS estão apresentados nos gráficos 9 e 10. Os valores da porcentagem de viabilidade celular obtidos foram da ordem de $100\% \pm 8,6$ e $88,34\% \pm 3,65$ para as linhagens HaCaT e HDFa respectivamente, sem apresentarem diferenças estatisticamente significantes quando comparadas ao controle ($p > 0,05$), indicando que o polímero não é citotóxico para HaCaT e HDFa.



Gráficos 9 e 10 – Valores expressos para porcentagem \pm desvio padrão. 9 - viabilidade de queratinócitos HaCaT semeados sobre o polímero PLGA-HA; 10 - viabilidade de fibroblastos HDFa semeados sobre o polímero PLGA-HA. Resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados como controle ($p > 0,05$). ANOVA e Teste t de Student.

O teste de viabilidade Live/Dead revelou, para a linhagem HaCaT, imagens com fluorescência verde uniforme, indicando alta taxa de viabilidade celular (Fig. 3A-C). O mesmo foi observado com a linhagem de fibroblastos, contudo, pontos de fluorescência vermelha foram visualizados 48 h após o contato do PLGA-HA com estas células indicando células mortas (Fig. 3D-F). Os resultados demonstram grande viabilidade celular de ambas as linhagens após serem semeadas sobre o PLGA-HA.

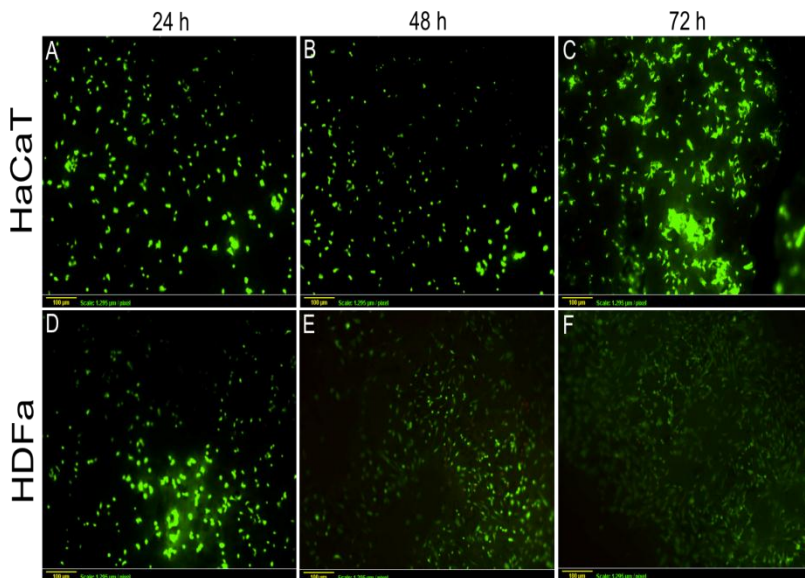


Fig. 3A-F – Células semeadas sobre discos de PLGA-HA analisadas pelo ensaio live/dead para os tempos experimentais 24, 48 e 72 h. *A-C* – imagens live/dead de queratinócitos HaCaT; *D-F* – imagens live/dead de fibroblastos HDFa. Células vivas coradas em verde, enquanto células vermelhas foram coradas de vermelho. Alta concentração de células viáveis em todos os tempos experimentais mostrando a compatibilidade do polímero.(Microscópio de Fluorescência)

3.3 - Teste de adesão celular

Após 24, 48 e 72 h da semeadura de fibroblastos e queratinócitos, a morfologia e adesão celular foram analisadas por meio de microscopia confocal (Fig. 4). Observou-se crescimento e espraio celular, compatível com células viáveis. Após 24 h (Fig. 4A e D) ambos os tipos celulares apresentaram-se em fase de espraio, com algumas células ainda não “achatadas”. Após 48 h (Fig. 4B-E) foi possível observar as células completamente espraídas, além do início da migração das mesmas para o interior dos polímeros. Decorridas 72 h (Fig. 4C-F), os queratinócitos começaram a expressar um agrupamento celular, enquanto os fibroblastos apresentaram completa migração em direção ao interior do polímero.

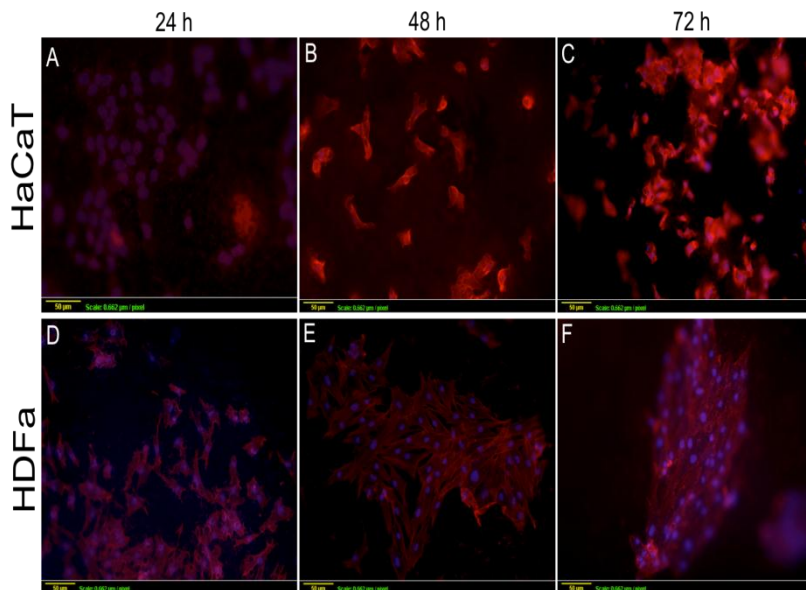


Fig. 4A-F - Células semeadas sobre discos de PLGA-HA analisadas por meio do microscópio confocal para os tempos experimentais 24, 48 e 72 h. A-C – imagens de queratinócitos HaCaT; D-F – imagens de fibroblastos HDFa. Nota-se o espraiamento celular sobre o PLGA-HA com penetração para o interior do polímero 72 h após a semeadura (Fig. C e F).

4 - DISCUSSÃO

As doenças periodontais (DP) e peri-implantares (DPi) acometem cerca de 80% da população mundial (Susin et al., 2004; Susin et al., 2005). O principal fator etiológico destas doenças é a presença de uma vasta e complexa microbiota oral e estudos vêm sendo desenvolvidos para elucidar a relação dessa microbiota com o surgimento e progressão das DP e DPi (Haffajee & Socransky, 2005).

Dentre as bactérias presentes no biofilme oral, destaca-se a *E. faecalis*, cuja escolha como modelo de estudo para o presente trabalho justifica-se por ser a espécie mais comum de enterococos e responsável por cerca 80-90 % das infecções em humanos causadas por estes patógenos (Colombo et al., 1998; Young et al 2001; Souto & Colombo, 2008; Gonçalves et al., 2009; Ramos et al., 2012; Rams et al., 2013;). Seu comportamento está bem definido na literatura e por este motivo, também, foi o microrganismo de escolha para este estudo.

Quando as bactérias estão sob a forma de biofilme, atuando em conjunto, as terapias antimicrobianas são dificultadas. A utilização de antibióticos é importante na terapia periodontal (Socransky & Haffajee, 2005), contudo, seu uso indiscriminado pode aumentar a resistência bacteriana. Além disso, estudos relataram que contra biofilmes complexos como o dental, os antibióticos atuam apenas nas espécies bacterianas periféricas (Sutherland, 1999; Socransky & Haffajee, 2002).

Diante desta dificuldade de controle bacteriano, alternativas de combate à formação do biofilme, que não gerem mutações ou favoreçam o aparecimento de resistência bacteriana, vêm sendo estudadas. Uma delas se dá por meio da inibição do mecanismo de comunicação das bactérias, que controla a formação de biofilme, o chamado “Quorum sensing” (Cha et al., 1998).

Dentre os compostos capazes de influenciar no QS destacam-se as furanonas sintéticas. Estudos revelaram ótimos resultados quando estes compostos foram utilizados para combater *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Kozminykh et al 1993; Ren et al., 2001). Brackman et al (2011), ao utilizarem modelos *in vitro* e *in vivo* de biofilmes, relataram que agentes inibidores de QS potencializam a ação de antibióticos, por meio do aumento da susceptibilidade das bactérias presentes no biofilme aos mesmos.

No presente estudo foram utilizados compostos da família das lactamas, cuja similaridade na composição química quando comparadas às furanonas indicam que sua capacidade de inibição do biofilme bacteriano ocorra através da interferência no mecanismo de QS. Foi objetivo desta pesquisa testar a capacidade de um trio de lactamas, inéditos, em inibir a formação de biofilme de cepas de *E. faecalis* sobre a superfície do polímero PLGA-HA.

Os testes de quantificação da inibição de aderência e formação de biofilme, mostraram uma grande capacidade inibitória das lactamas na formação de biofilme sobre a superfície do polímero PLGA-HA (Fig. 2C-E). As reduções tiveram médias superiores a 99%, o que corrobora com resultados de estudos que utilizaram furanonas e poliestireno (Gottenbos 2000; Baveja et al 2004; Weng et al. 2012). Neste teste, as lactamas foram utilizadas na concentração de 87,5 mg/ml, pois estudos prévios indicam esta concentração como a Concentração Inibitória Mínima de Biofilme (CIM) para estes compostos (dados não publicados).

As imagens obtidas por meio do MEV confirmaram os dados do teste descrito acima (Figura 2C-F). Pode-se notar o número reduzido de colônias bacterianas aderidas nos polímeros dos grupos expostos às

lactamas sintéticas. Baveja et al. (2004) recobriram polímeros com compostos sintéticos da família da furanonas e obtiveram resultados semelhantes.

Estudos revelaram resultados satisfatórios quando furanonas foram adicionados a resinas e cimentos ionômero de vidro (Weng et al., 2012a, b). Entretanto, ainda há escassez de trabalhos que comprovem a aplicação desses compostos no tratamento da doença periodontal. Tendo em vista a capacidade de inibição de aderência e formação de biofilme dos mesmos, novos estudos se fazem necessários para o entendimento do mecanismo de ação destes compostos.

A capacidade antibacteriana das NpAg também foi testada, em meio aquoso. Diferentemente das lactamas, que acredita-se atuar no mecanismo regulatório do biofilme, as NpAgs são reconhecidas como antimicrobianos convecionais, isto é, atuam sobre a viabilidade bacteriana. Uma das propostas para seu mecanismo de ação é de que íons de prata liberados pela NpAgs possam atuar combinando-se com o fosfato das moléculas do DNA das bactérias, resultando na inativação da sua replicação.

No presente trabalho optou-se por avaliar a capacidade das NpAgs em inibir a formação de biofilmes bacterianos, em detrimento da análise de sua atividade antimicrobiana convencional. Para isso, as NpAgs foram utilizadas nos testes aqui apresentados em concentrações subinibitórias, nas quais seu efeito sobre o crescimento bacteriano era inferior ao efeito exercido sobre a aderência bacteriana (resultados preliminares não apresentados). Isso porque esses compostos tem comprovada atividade de resistência bacteriana. Os resultados dos testes de aderência e inibição de biofilme revelaram inibição de quase 100% do biofilme. A Fig. 2F ilustra tais resultados, e demonstra diminutas colônias bacterianas sobre o polímero exposto à NpAg. Diversos estudos apresentaram resultados semelhantes quanto à capacidade antimicrobiana das NpAg (Lok et al 2007; Lee et al 2007; Zang et al 2008), contudo nosso estudo sugere que a interferência do composto foi na formação do biofilme e não matando bactérias, eliminando e/ou diminuindo a possibilidade de resistência bacteriana (Sondi, Salopek-Sondi, 2004; Lok et al., 2006).

Atualmente não existe consenso quanto aos valores ideais de concentração inibitória mínima (CIM) para as nanopartículas de prata (Chopra, 2007). O autor ressalta a existência de estudos que, mesmo seguindo os parâmetros estabelecidos pela National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, Pennsylvania, USA) e pelo Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobianos

(EUCAST), demonstraram resultados diversos. O autor ainda justifica a utilização de uma alta dosagem do produto (70-100 ppm) pelo receio de a administração de subdoses poder estimular o aparecimento de microrganismos resistentes.

Autores sugerem valores de CIM entre 8 a 80 mg/L em estudos desenvolvidos utilizando *S. aureus*. em uma concentração inicial de 100 UFC (Ug, et al. 2003, O'Neill & Chopra 2004; Hamilton-Miller, et al. 1993). Berger et al. (1976) e Thibodeau et al. (1978) obtiveram valores de CIM entre 0,68 ppm e 20 ppm utilizando outro parâmetro de medida. Sondi e Salopek-Sondi (2004) sugeriram que a diferença nos resultados esteja relacionada à utilização de diferentes metodologias, já que os constituintes do meio de cultura podem influenciarem os efeitos dos íons de prata sobre os microrganismos.

A concentração utilizada neste estudo foi de 5 ppm, baseada em estudos preliminares cujos resultados indicaram que nessa concentração o efeito das nanopartículas de prata sobre o biofilme de *E. faecalis* sobrepuja-se ao seu efeito antimicrobiano convencional (resultados não apresentados).

Os resultados apresentados revelaram a capacidade de ação sobre o biofilme de *E. faecalis*, tanto das lactamas sintéticas quanto das NpAgs. Este estudo é pioneiro na comparação destes dois tipos de compostos com potencial aplicação no combate às infecções bacterianas, as lactamas, que atuam potencialmente via interferência no mecanismo de QS, e as NpAgs, cujo mecanismo de inibição de biofilme nas concentrações subinibitórias aqui testadas é ainda desconhecido.

Contudo, para utilização destes compostos como antibacterianos ou antibiofilme, é necessário que eles não apresentem ação tóxica contra células humanas (Cooper & Johnson, 1991). O presente estudo testou a compatibilidade desses compostos com queratinócitos e fibroblastos humanos. Estas linhagens são apontadas na literatura como as principais constituintes dos tecidos moles periodontal e peri-implantar (Loe et al, 1971). Além disso, a utilização de duas linhagens celulares humanas nos testes de citotoxicidade aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos para os compostos testados.

Para avaliar a toxicidade das lactamas e NpAgs contra células humanas, foi utilizado o ensaio MTT. A leitura dos valores de absorbância das células em contato com as lactamas revelou alto índice de viabilidade (> 80%). Taxas de viabilidade superiores a 70% caracterizam “baixa toxicidade” do composto e confirmam que o mesmo está dentro da escala de utilização segura (Cao et al 2010; Baveja et al

2004). Este é o primeiro estudo a utilizar estes tipos de lactamas e, a partir dos resultados obtidos, sugere-se que tais compostos apresentem um potencial para serem utilizados como agentes inibidores do biofilme. Cabe ressaltar que, na concentração de 5 mg/ml (CIM), apenas o composto U 21-1 apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$) quando testado em queratinócitos (Gráfico 1).

A viabilidade das células em contato com as NpAg, apresentada nos gráficos 4 e 8, foi alta para ambos os tipos celulares, quando utilizadas concentrações inferiores a 10 ppm (viabilidade > 70%). Contudo, os testes estatísticos mostram diferenças significantes entre todas as concentrações das NpAgs quando comparadas ao controle (Gráficos 4 e 8). Tal fato pode ser explicado pelo baixo DP que os testes apresentaram e não deve desestimular a continuação dos estudos para utilização deste composto.

Polímeros biodegradáveis são utilizados em diversas áreas da medicina e odontologia (Ma, 2004; Park et al., 2005). A incorporação de agentes antibiofilme e antibacterianos a estes polímeros é relatada como uma alternativa de combate a infecções. Para que tenham aplicação clínica favorecida, estes polímeros devem possibilitar a adesão e proliferação, além de não comprometer a viabilidade celular.

Neste estudo, optou-se pela utilização de um polímero de PLGA acrescido de hidroxiapatita (HA) pois estes apresentaram resultados satisfatórios para viabilidade e proliferação celular (Pereira-Neto, 2010).

A citotoxicidade do PLGA-HA frente às células humanas foi avaliada por meio de ensaio MTS, o qual não revelou diferenças estatisticamente significantes entre porcentagem de células viáveis sobre o PLGA-HA e o grupo controle para as linhagens de queratinócitos e fibroblastos (Gráficos 9 e 10). Esses resultados corroboram com estudos já realizados (Fortunati et al. 2011; Cheng et al., 2012) que, ao analisarem o comportamento de fibroblastos, osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas frente ao mesmo polímero, obtiveram resultados semelhantes. A viabilidade celular foi confirmada por meio do teste Live/Dead, que revelou predominância de células viáveis (fluorescência verde) nos períodos testados.

A adesão celular foi avaliada por meio da microscopia confocal. Utilizou-se a faloidina para marcação do citoesqueleto, pois este é o principal responsável pelo processo de adesão celular (Freshney, 1990). A marcação do núcleo foi feita com DAPI, e quando este apresentava-se íntegro, foi considerado não haver alterações funcionais.

A partir das imagens obtidas, foi possível observar o início da adesão celular no período de 24 h (Fig. 4A-D), para fibroblastos e queratinócitos com ligeiro espreadimento. Após 48 horas, foi notado completo espreadimento celular (indicativo de adesão), com princípios de agrupamento e penetração no polímero (Fig. 4B-E). Após 72 h, observa-se migração celular para o interior do polímero indicando que o PLGA-HA não afetou realmente o citoesqueleto.

4.1 – Perspectivas futuras

5 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que as lactamas e as NpAgs apresentam grande potencial de ação antibiofilme contra *E. faecalis*.

No que diz respeito à uma possível utilização terapêutica destes compostos os testes de toxicidade em presença de células humanas mostraram que na CIM, as lactamas e as NpAgs apresentam alto índice de viabilidade celular, para os principais tipos celulares que compõem o periodonto de sustentação. Sugere-se que mais estudos sejam desenvolvidos a fim de avaliar seu efeito no tratamento das doenças periodontais, todavia com os resultados apresentados.

O polímero PLGA-HA, por possibilitar a proliferação, penetração e adesão celular, torna-se um possível carreador para utilização destes agentes antimicrobianos e antibiofilme. A aplicação desse dispositivo sobre componentes protéticos de implantes osseointegráveis, além de barreira física para o processo de regeneração tecidual e óssea, é vislumbrado, potencializando resultados de terapias antibacterianas e prevenindo infecções.

Tomados em conjunto, estes resultados indicam que as lactamas e as NPsAg apresentam um bom potencial para utilização na terapia antibacteriana em dispositivos implantáveis, possivelmente combinadas à carreadores tais como o PLGA-HA.

CAPÍTULO IV

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ARESTRUP, F.M.; BUTAYE, P.; WITTE, W. Nonhuman reservoirs of enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunne GM, Murray BE, Rice LB, eds. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. Washington, DC: ASM Press; 2002:55-99.

AAS, J.A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43:5721-5732, 2005.

ABREU, M.H.; BIANCHINI, M.A.; MAGINI, R.S.; RÖSING, C.K. Clinical and radiographic evaluation of periodontal and peri-implant conditions in patients with implant-supported prosthesis. *Acta Odontol Latinoam*, 20(2):87-95, 2007.

ALOISI, G.G.; COSTANTINO, U.; LATTEINI, L.; NOCCHETTI, M.; CAMINO, G.; FRACHE, A. Preparation and spectroscopic characterisation of intercalation products of clay and of clay-polypropylene composites with rhodamine B. *J Phys Chem Solids*, 67:909-14, 2006.

ALOISI, G.G.; ELISEI, F.; NOCCHETTI, M.; CAMINO, G.; FRACHE, A.; COSTANTINO, U.; LATTEINI, L. *Mater Chem Phys*, 123:3777-9, 2010.

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6:637-655, 2008.

BALAEI-GAJAN, E.; SHIRMOHAMMADI, A.; ABASHOV, R.; AGAZADEH, M.; FARAMARZIE, M. Detection of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm of patients with chronic refractory periodontitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 15:e667-e670, 2010.

BAVEJAA, J.K.; LIB, G.; NORDON, R.E.; HUME, E.B.H.; KUMAR, N.; WILLCOX, M.D.P.; POOLE-WARREN, B.

L.A. Biological performance of a novel synthetic furanone-based antimicrobial. *Biomaterials*, 25:5013–5021, 2004.

BAVEJAA, J.K.; WILLCOXA, M.D.P.; HUME, E.B.H.; KUMAR, N.; ODELL, R.; POOLE-WARREN, L.A. Furanones as potential antibacterial coatings on biomaterials. *Biomaterials*, 25:5003–5012, 2004. **b.**

BERGLUNDH, T.; LINDHE, J.; MARINELLO, C.P.; ERICSSON, I.; LILJENBERG, B. Soft tissue reactions to de novo plaque formation and implants in teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*, 3:1–8, 1992.

BERGER, T.J.; SPADARO, A.J.; CHAPIN, S.E.; BECKER, R.O. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 9(2):357–8, 1976.

BOCKSTALLER, M.R.; MICKIEWICZ, R.A.; THOMAS, E.L. Block copolymer nanocomposites: perspectives for tailored functional materials. *Adv Mater*, 17:1331–49, 2005.

BRACKMAN, G.; COS, P.; MAES, L.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Quorum Sensing Inhibitors Increase the Susceptibility of Bacterial Biofilms to Antibiotics In Vitro and In Vivo. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2655–2661, 2011.

CAO, X.L.; CHENG, C.; MA, Y. L.; ZHAO, C. S. Preparation of silver nanoparticles with antimicrobial activities and the researches of their biocompatibilities. *J Mater Sci: Mater Med*, 21:2861–2868, 2010.

CARNIOL, K. GILMORE, M.S. Signal Transduction, Quorum-Sensing, and Extracellular Protease Activity in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 186:8161–8163, 2004.

CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y.C.; SHAW, P.D.; FARRAND, S.K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 11(11):1119–29, 1998.

CHENG, Y.; WU, J.; GAO, B.; ZHAO, X.; YAO, J.; MEI, S.; ZHANG, L.; REN, H. Fabrication and in vitro release behavior of a novel antibacterial coating containing halogenated furanone-loaded poly(L-

lactic acid) nanoparticles on microarc-oxidized titanium. *Inter J Nanomedicine*, 7:5641–5652, 2012.

CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4): 587-590, 2007.

COLOMBO, A.P.; HAFFAJEE, A.D.; DEWHIRST, F.E. et al. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 25:169-180, 1998.

COOPER, A.J.; JOHNSON, C.D. Animal experimentation. *Br J Surg*, 78(12):1409-11, 1991.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2(2):114-22, 2003.

DAROUCHE, R.O. Anti-Infective Efficacy of Silver-Coated Medical Prostheses. *Clin Infect Dis*, 29:1371–7, 1999.

DESHPANDE, L.M.; FRITSCH, T.R.; MOET, G.J.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: A report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58:163-170, 2007.

ERICSSON, I.; BERGLUNDH, T.; MARINELLO, C.P.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin Oral Implants Res*, 3:99-103, 1992.

FACHON-KALWEIT, S.; ELDER, B.L.; FIVES-TAYLOR, P. Antibodies that bind to fimbriae block adhesion of *Streptococcus sanguis* to saliva-coated hydroxyapatite. *Infect Immun*, 48(3):617-24, 1985.

FIVES-TAYLOR, P.M.; THOMPSON, D.W. Surface properties of *Streptococcus sanguis* FW213 mutants nonadherent to saliva-coated hydroxyapatite. *Infect Immun*, 47(3):752-9, 1985.

FORTUNATI, E.; LATTERINI, L.; RINALDI, S.; KENNY, J. M.; ARMENTANO, I. PLGA/Ag nanocomposites: in vitro degradation study and silver ion release. *J Mater Sci: Mater Med*, 22:2735–2744, 2011.

FRESHNEY, R.I. Biology of the cultured cell: a manual of basic technique. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1990. p.347.

GIRIDHARA-UPADHYAYA, P.M.; UMAPATHY, B.L.; RAVIKUMAR, K.L. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Lab Physicians*, 2:100-104, 2010.

GONÇALVES, L.S.; SOUTO, R.; COLOMBO, A.P. Detection of *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, and *Pseudomonas aeruginosa* in the subgingival biofilm of HIV-infected subjects undergoing HAART with chronic periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28: 1335-1342, 2009.

GUPTA, A.; MAYNES, M.; SILVER, S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 64(12):5042-5045, 1998.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontology* 2000, 38:9–12, 2005.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2(2):95-108, 2004.

HAMILTON-MILLER, J.M.; SHAH, S.; SMITH, C. Silver sulphadiazine: a comprehensive in vitro reassessment. *Chemotherapy*, 39(6):405-409, 1993.

HANCOCK, L.E.; GILMORE, M.S. Pathogenicity of enterococci. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JJ, eds. *Gram-Positive Pathogens*, 2nd edition. Washington, DC: ASM Press; 2006:299-311.

HE, Z.; WANG, Q.; HU, Y.; LIANG, J.; JIANG, Y.; MA, R.; TANG, Z.; HUANG, Z. Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to

interfere with biofilmformation by Streptococcus mutans and its luxS mutant strain. *Inter J Antimicrobial Agents*, 40:30– 35, 2012.

HEITZ-MAYFIELD, L.J.A. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Clin Oral Implants Res*, 35(Suppl. 8):292-304,2008.

HENTZER, M.; GIVSKOV, M.Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections.*J Clin Invest*,112(9):1300-7, 2003.

HENTZER, M.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T.B.; HEYDORN, A.; ANDERSEN, J.B.; PARSEK, M.R.; RICE, S.A.; EBERL, L.; MOLIN, S.; HØIBY, N.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M.Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria by a halogenated furanone compound.*Microbiology*,148:87-102, 2002.

HENTZER, M.; WU, H.; ANDERSEN, J.B.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T.B.; BAGGE, N.; KUMAR, N.; SCHEMBRI, M.A.; SONG, Z.; KRISTOFFERSEN, P.; MANEFIELD, M.; COSTERTON, J.W.; MOLIN, S.; EBERL, L.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; HØIBY, N.; GIVSKOV, M.Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors.*EMBO J*, 22(15):3803-15, 2003.

KOZMINYKH, V.O.; IGIDOV, N.M.; KOZMINYKH, E.N.; ALIEV, Z.G.Reactions of 5-aryl-furan-2,3-diones with acylmethylenetriphenylphosphoranes: synthesis and biological activity of 3(2H)-furanone derivatives.*Pharmazie*, 48(2):99-106, 1993.

LATTERINI, L.; NOCCHETTI, M.; COSTANTINO, U.; ALOISI, G.G.; ELISEI, F.Organized chromophores in layered inorganic matrices. *Inorg Chim Acta*, 360:728–40, 2007.

LEE, H.Y.; PARK, H.K.; LEE, Y.M.; KIM, K.;PARK, S.B. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterialevaluation for biomedical applications. *Chem Commun*,28:2959-2961, 2007.

LEE, J.Y.; NAGAHATA, J.L.R.; HORIUCHI, S. Effect of metal nanoparticleson thermal stabilization of polymer/metal nanocomposites preparedby a one-step dry process. *Polymer*, 47:7970–9, 2006.

LIMA PIMENTA, A. de, DI MARTINO, P., LE BOUDER, E., HULEN, C., BLIGHT, M.A. In vitro identification of two adherence factors required for in vivo virulence of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbes Infect* 5:1177-1187, 2003.

LISTGARTEN, M.A. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol*, 47: 1-18, 1976

LISTGARTEN, M.A. Dental plaque: its structure and prevention. *ASDC J Dent Child*, 39(5):347-52, 1972.

LISTGARTEN, M.A.; MAYO, H.E.; TREMBLAY, R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 46: 10-26, 1975.

LÖE H.; KARRING, T. The three-dimensional morphology of the epithelium-connective tissue interface of the gingiva as related to age and sex. *Scand J Dent Res*, 79(5):315-26, 1971.

LOK, C.N.; HO, C.M.; CHEN, R.; HE, Q.Y.; YU, W.Y.; SUN, H.; et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*, v.5, n.4, p:916-924, 2006.

MA, P.X. Scaffold for Tissue Engineering. *Materials Today*, 7:30-40, 2004

MANEFIELD, M.; RASMUSSEN, T.B.; HENZTER, M.; ANDERSEN, J.B.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, 148:1119-27, 2002.

MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol*. v.69, n.7, p:4278-4281, 2003.

MOHAMED, J.A. HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*, 56:1581-1588, 2007

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and

survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunolog. Methods*, 65:55-63, 1983.

MUSK, D.J. JR.; HERGENROTHER, P.J. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. *Curr Med Chem*, 13(18):2163-77, 2006.

NEO, M.; KOTANI, S.; NAKAMURA, T. A comparative study of ultrastructure of the interfaces between four kinds of surface-active ceramic and bone. *J Biomed Mater Res*, 26:1419-32, 1992.

OHURA, K.; NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T. Bone-bonding ability of P2O5-free CaO.SiO2 glasses. *J Biomed Mater Res*, 25:357-65, 1991.

O'NEILL, A.J.; CHOPRA, I. Preclinical evaluation of novel antibacterial agents by microbiological and molecular techniques. *Expert Opin Investig Drugs*, 13(8):1045-1063, 2004.

PARK, G.E.; PATTISON, M.A.; PARK, K.; WEBSTER, T.J. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials*, 26:3075-86, 2005.

PEREIRA NETO, A.R.L. Análise do comportamento de fibroblastos gengivais cultivados sobre diferentes tipos de membranas absorvíveis. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RAMOS, M.P.; FERREIRA, S.M.; SILVA-BOGHOSSIAN, C.M. et al. Necrotizing periodontal diseases in HIV-infected Brazilian patients: A clinical and microbiologic descriptive study. *Quintessence Int*, 43:71-82, 2012.

RAMS, T.E.; FEIK, D.; MORTENSEN, J.E.; DEGENER, J.E.; VAN WINKELHOFF, A.J. Antibiotic Susceptibility of Periodontal *Enterococcus faecalis*. *J Periodontol*, 84:1026-1033, 2013.

REN, D.; SIMS, J.J.; WOOD, T.K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ Microbiol*, 3(11):731-6, 2001.

REN, D.; SIMS, J.J.; WOOD, T.K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Lett Appl Microbiol*, 34(4):293-9, 2002.

RICHARDS JJ, MELANDER C. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem*, 21;10(14):2287-94, 2009.

SIEUWERTS, A.M. KLIJN, J.G.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 33(11):813-23, 1995.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000, 38:135–187, 2005.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000, 28:12–55, 2002.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, 275(1):177-182, 2004.

SOUTO, R.; COLOMBO, A.P.V. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Archives of oral biology*, 53:155 – 160, 2008.

STEVENS, K.N.J.; CRESPO-BIEL, O. The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. *Biomaterials*, 30:3682–90, 2009.

SUTHERLAND, I.W. Biofilm matrix polymers – role in adhesion. In: Newman HN, Wilson M, ed. Dental plaque revisited. Cardiff: Bioline, 49–62, 1999.

SUN, B.; RANGANATHAN, B.; FENG, S.S. Multifunctional poly(DL-Lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. *Biomaterials*, 29:475–86, 2008.

TJONG, S.C. Structural and mechanical properties of polymernanocomposites. *Mater Sci Eng R*, 53:73–197, 2006.

UG, A.; CEYLAN, O. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Arch Med Res*, 34(2):130-136, 2003.

WANG, Y.; CHALLA, P.; EPSTEIN, D.L.; YUAN, F. Controlled release of ethacrynic acid from poly(lactide-co-glycolide) films for glaucoma treatment. *Biomaterials*, 25:4279–85, 2004.

WENG, Y.; HOWARD, L.; CHONG, V.J.; SUN, J.; GREGORY, R.L.; XIE, D. A novel furanone-modified antibacterial dental glass ionomer cement. *Acta Biomaterialia*, 8:3153–3160, 2012.

WENG, J.; HOWARD, L.; GUO, X.; CHONG, V.J.; GREGORY, R.L.; XIE, D. A novel antibacterial resin composite for improved dental restoratives. *J Mater Sci Mater Med*, 23:1553–1561, 2012.

YOUNG, M.P.; CARTER, D.H.; WORTHINGTON, H.; KORACHI, M.; DRUCKER, D.B. Microbial analysis of bone collected during implant surgery: a clinical and laboratory study. *Clin Oral Implants Res*, 12(2):95-103, 2001.

ZHANG, Y.; PENG, H.; HUANG, W.; ZHOU, Y.; YAN, D. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*, 325(2):371-376, 2008.

ZITZMANN, N.U.; BERGLUNDH, T. Definition and prevalence of peri-implant disease. *J Clin Periodontol*, 35(Suppl. 8):286-91, 2008.